

Zur Charakterisierung der Fettsäuredehydrogenasen aus Leber

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel

von

John von Bülow-Köster

aus Basel



Zentral-Verlag für Dissertationen Triltsch Düsseldorf

1959

Zur Charakterisierung der Fettsäuredehydrogenasen aus Leber

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität Basel



John von Bülow-Köster

aus Basel



Zentral-Verlag für Dissertationen Triltsch Düsseldorf

1959

Genehmigt von der Philosophisch-naturwissenschaftlichen Fakultät auf
Antrag der
Herren Professoren Dr. K. Bernhard und Dr. T. Reichstein

Basel, den 10. Februar 1959

Prof Dr. Rud. Geigy
Dekan

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	6
II. Problemstellung	8
III. Nachweis von Dehydrierungen durch Methylenblau-Entfärbungen . . .	8
A) Allgemeines	8
B) Experimentelles	10
a) Herstellung des Fermentextraktes	10
b) Dehydrierungsversuche mit verschiedenen Fettsäuren	11
1. Apparatur	11
2. Reagentien	11
3. Mengenverhältnisse pro Kölbchen	12
c) Bestimmung der Menge entfärbten Methylenblaus	12
d) Aktivitätssteigerung des Ferments durch Folsäure	12
e) Herstellung von 2-Octadecensäure	13
C) Diskussion der Ergebnisse	13
IV. Dehydrierung von ^{14}C -Stearinsäure	14
A) Allgemeines	14
B) Experimentelles	16
a) Tiermaterial	16
b) Herstellung der Fermentextrakte	16
c) Synthese der ^{14}C -Carboxyl-signierten Stearinsäure	16
d) Aufarbeitung des Reaktionsgemisches	17
1. Extraktion der Lipide und Fettsäuren aus dem Reaktions-	17
gemisch	
2. Trennung der Leberlipide von den Fettsäuren	18
3. Oxydation der Fettsäuren	18
4. Papierchromatographie der Fettsäuren und Dicarbonsäuren .	19
e) Dehydrierungsversuche	19
1. Versuche nach der Methylenblautechnik mit Leberextrakten	19
nach Le Breton (Versuche I, II, III)	
2. Versuche mit Mitochondrien (Versuche IV und V)	21
3. Dehydrierungen mit Gesamthomogenat aus Leber (Versuche	23
VI und VII)	
4. Dehydrierungen mit Mitochondrien und Überstehendem	25
(Versuch VIII)	
5. Dehydrierungen wie Versuche I, II und III, aber in Gegen-	26
wart von Sauerstoff (Versuche IX und X)	
C) Diskussion der Ergebnisse	28
V. Einbau der ^{14}C -Stearinsäure in Neutralfett und Phosphatide des Leber-	29
homogenates	
VI. Zusammenfassung	30
Literaturverzeichnis	31

Herrn Prof. Dr. K. Bernhard, auf dessen Veranlassung die vorliegende Arbeit entstand, möchte ich an dieser Stelle für seine Hilfe und Ratschläge danken.

Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

I. EINLEITUNG

Die Umwandlung von Stearinsäure in Ölsäure und deren Rückwandlung in Stearinsäure im Tierkörper wurde lange vermutet und in der Folge von verschiedenen Autoren zu beweisen versucht.

Schönheimer und *Rittenberg* (1) verfütterten Mäusen deuteriumhaltige Fettsäuren und isolierten aus dem Körperfett deuteriumhaltige ungesättigte Fettsäuren. *Stetten* und *Schönheimer* (2) verabreichten Deuterio-Palmitinsäure, wobei sie aus dem Körperfett Palmitoleinsäure sowie auch kurzkettige Fettsäuren und Stearinsäure, alle deuteriumhaltig, isolieren konnten.

Die Frage, ob die Doppelbindung in vivo auch oxydativ aufgespalten werden kann wie in vitro, und das Verhalten der Dreifachbindung im Körper wurde von *Gloor* (3) mit Hilfe der Isotopenverdünnungstechnik untersucht. Er zeigt, dass bei Verfütterung von Ölsäure zusammen mit deuteriumhaltiger Azelainsäure letztere ohne Verdünnung wieder ausgeschieden wurde. Die Azelainsäure als oxydatives Spaltprodukt der Ölsäure ist also kein Intermediärprodukt des Fettsäureabbaus. Wurde statt Ölsäure Stearolsäure verfüttert, so wies die im Harn wieder ausgeschiedene Azelainsäure einen geringeren Gehalt an Deuterium auf. Die oxydative Spaltung der Dreifachbindung im Tierkörper konnte somit bewiesen werden.

Rothlin (4) untersuchte die Hydrierung und Dehydrierung von Fettsäuren im Tierkörper. Nach Verfütterung von ^{14}C - γ -Linolen-, Linol- und Ölsäure, wies die aus den Leberfettsäuren isolierte Stearinsäure keine Aktivität auf, die auf eine direkte Hydrierung der hochaktiven ungesättigten ^{14}C -Säuren schliessen liess, während im umgekehrten Fall, nach Verfütterung einer markierten Stearinsäure, eine Ölsäure mit hoher Stosszahl isoliert werden konnte.

Verschiedene Autoren haben in der Folge das Vorhandensein einer Fettsäuredehydrogenase untersucht.

Nach *Quagliarello* (5, 6, 7) befindet sich ein Stearinsäure-dehydrierendes Enzym in der Galle, sowie eine auf höhere Fettsäuren wirksame Dehydrogenase in den Zellen des Fettgewebes. *Syunitiro Yosii* (8) extrahierte aus Fettgewebe Leber und Pankreas eine Dehydrogenase, die, in Gegenwart von gesättigten Fettsäuren mit mehr als 10 C-Atomen als Substrat, Methylenblau entfärbt. Die gleiche Wirkung konnte mit Ölsäure jedoch nicht mit Linol- oder Linolensäure beobachtet werden, ebenso wenig mit gesättigten Fettsäuren unter acht C-Atomen. *Lang* (9, 10, 11, 12) befasste sich mit der Isolierung des Enzyms aus Leber und Muskeln. Er folgerte, nach Isolierung von Azelalinaldehydsäure als Dinitrophenylhydrazon aus dem Ozonisierungsprodukt seines Reaktionsgemisches (12); dass die höheren Fettsäuren in

9,10-Stellung dehydriert werden. Er zeigte jedoch auch, dass ungesättigte Fettsäuren wie Öl- und Linolsäure ebenso von der Dehydrogenase angegriffen werden, wenn auch wesentlich schwerer. Als Aktivator des Ferments erwiesen sich Muskel-Adenylsäure, Adenosin und ATP. *Cremer* (13) konnte mit der Langschen Technik das Vorhandensein der Dehydrogenase in allen Organen und im Fettgewebe der Ratte, sowie auch in der Leber und im Darm des Kaninchens nachweisen. *Glaser* (14) beschrieb die Dehydrierung von Distearin und Palmitinsäure-Aethylat durch überlebende Ratten- und Kaninchen-Organschnitte.

Annau (15, 16, 17) isolierte aus Rinderleber ein Enzym, das mit Hypoxanthin als Aktivator Lecithin und auch Stearin- und Palmitinsäure dehydriert, Ölsäure jedoch nicht angriff. *Mazza* und *Marfori* (18, 19) beobachteten, dass ein Enzymextrakt, der analog desjenigen von Lang erhalten worden war, ausser 9,10-Ölsäure auch 2-Octadecensäure angriff. Bei Verwendung von Stearin- und Ölsäure als Substrat stellten sie durch spektrographische Untersuchungen fest, dass eine Doppelbindung in α , β auftritt.

Eine durch Adenylsäure und anorganischem Phosphat aktivierte Fettsäuredehydrogenase fanden *Shapiro* und *Wertheimer* (20) in Fettgewebe, Leber, Muskeln, Herz und Testes von Ratten.

Le Breton und Mitarbeiter (21, 22, 23, 24, 25, 26, 29), verbesserten die Langschen Enzymaufbereitungsmethoden und erhielten Extrakte von höherer Aktivität, die Methylenblau im Thunbergversuch in Gegenwart von Natriumpalmitat als Substrat wesentlich schneller entfärbten. Sie untersuchten (22, 23) die Rolle von Nicotinamid, Pyridoxin, Pantothensäure als Aktivator der Dehydrogenase und fanden (24), dass eine vorherige Phosphorylierung nötig ist, damit die Langsche Dehydrogenase eine Doppelbindung in 9,10-Stellung einführen kann. Nach Untersuchungen von *A. Jacob und Mitarbeitern* (27, 28, 29, 30, 31) soll sich das Enzymsystem im Cytoplasma befinden (29, 30) und neben der eigentlichen Dehydrogenase, eine Phosphorylase und eine Xanthinoxidase enthalten (30, 31).

Burton (32) wiederholte die Versuche von Lang und Mazza und zeigte, dass beide Enzyme entweder durch Adenylsäure oder Hypoxanthin aktiviert werden können.

Fantl und Lincoln (33) fanden u. a., dass Palmitinsäure durch Leberextrakte mit Adenylsäure als Aktivator im Ausmass von etwa 10% zu Palmitoleinsäure dehydriert wird. Sie wiesen die ungesättigten Fettsäuren durch Ozonolyse nach.

Tatsu Koyanagi (34) und *Harunobu Noro* (35) brauchten prinzipiell die gleichen Versuchsbedingungen wie Lang, nur dass sie Fumarat und ATP zum Reaktionsgemisch zugeben und hiermit im Gegensatz zu Lang auch kurz-kettige Fettsäuren leicht dehydrieren konnten. Als wirksame Coenzyme fanden sie FAD, Adenylsäure und Hypoxanthin. Sie nehmen an, dass die Fettsäuredehydrogenase zu den Flavinenzymen gehört.

W. Franke und Mitarbeiter (36) nahmen anstelle von Methylenblau 2,6-Dichlorindophenol oder Bindschedlergrün als Acceptor im Thunbergversuch

und beobachteten eine intensive Dehydrierung von ungesättigten Fettsäuren (Ol-, Linol- und Linolensäure) durch Leberenzym. Durch die Dehydrierbarkeit von 9,10- und 2,3-Dibromstearinsäure vermuteten sie, dass eine 2,3- sowie eine 9,10-Dehydrierung nebeneinander stattfindet.

II. PROBLEMSTELLUNG

Wie aus der gegebenen Literaturübersicht hervorgeht, erfolgte der Nachweis von Dehydrogenasen höherer Fettsäuren vornehmlich vermittelt der Methylenblautechnik nach *Thunberg* (37). Aus der Entfärbungsgeschwindigkeit zogen zahlreiche Autoren Schlüsse auf die Spezifität und Aktivität der Dehydrogenase. Ein überzeugender Nachweis aus Stearinsäure entstandener Ölsäure fehlt.

Bei der Herstellung der Leberhomogenate gelangen zweifellos auch Leberlipide, und demzufolge Ölsäure, in das Reaktionsgemisch. Das aus dem zugefügten Substrat (Stearinsäure) erwartete Endprodukt, die Ölsäure, dürfte demnach bereits vorhanden sein.

Wir versuchten den einwandfreien Nachweis einer fermentativen Dehydrierung der Stearinsäure zu Ölsäure unter Heranziehung der Isotopentechnik und durch Isolierung bzw. Charakterisierung des Endproduktes zu erbringen. Dabei wurden zuerst die Befunde von *Lang* und *Le Breton* nachgearbeitet und der Versuch unternommen, das Ferment mittelst der Thunbergschen Acceptor-Methode weiter zu charakterisieren.

III. NACHWEIS VON DEHYDRIERUNGEN DURCH METHYLENBLAUENTFÄRBUNG

A) Allgemeines

Erfolgte die Fermentanreicherung nach *Le Breton* (21), so ergaben sich folgende Beobachtungen:

1. Bei Zugabe einer kleinen Menge Adenosin *entfärbten* sich die Proben mit Substrat, die Blindproben ohne Substrat aber *nicht*. Wurde jedoch mehr Adenosin zugegeben, so entfärbten sich auch die Blindproben.

2. Unter der Voraussetzung, dass die Menge des entfärbten Methylenblaus der Menge der dehydrierten Säure entspricht, wurde stets mehr Substrat dehydriert, als zugesetzt war.

Entfärbungszeiten des Methylenblaus im Thunbergversuch:

Tabelle I

Versuchs-Nr.	I	II
Behen	2'00''	1'00''
Arachin	2'30''	2'30''
Stearin	4'00''	3'00''
Margarin	4'30''	4'00''
Palmitin	4'30''	4'30''
Laurin	5'00''	6'30''

Tabelle II

Versuchs-Nr.	I	II	III	IV	V	VI
Behenol	1'45''	2'05''	1'50''	2'20''	2'15''	2'45''
Behen	1'55''	2'20''	1'55''	2'35''	2'10''	2'35''
Brassidin	2'15''	2'50''	2'15''	2'30''	3'05''	2'15''
Eruca	3'25''	3'25''	2'10''	3'25''	3'10''	3'45''
Elaidin	3'25''	3'25''	2'35''	4'00''	3'10''	5'00''
Öl	3'25''	3'45''	2'50''	5'00''	4'25''	5'00''

Tabelle III

Versuchs-Nr.	I	II	III	IV	V	VI	VII
Behenol	2'35''	0'55''	0'50''	1'30''	1'15''	1'30''	2'15''
Behen	3'10''	1'00''	0'55''	2'10''	1'40''	2'05''	1'45''
Stearin	2'45''	1'20''	0'55''	2'05''	2'05''	1'50''	1'50''
Brassidin	4'50''	1'25''	1'10''	1'50''	1'55''	2'20''	2'00''
Elaidin	3'35''	1'40''	1'25''	1'55''	2'30''	2'45''	2'05''
Eruca	4'00''	2'10''	1'20''	2'35''	3'30''	2'50''	2'30''
Stearol	4'15''	2'25''	2'40''	2'35''	2'55''	10'00''	2'10''
Öl	5'10''	3'25''	2'45''	2'45''	17'00''	10'00''	3'30''

3. Die hergestellten Leberextrakte enthalten Leberlipide, die gleich dem zugefügten Substrat dem fermentativen Angriff ausgesetzt sein können. Wir haben zu den oben erwähnten Extrakten aus Leber verschiedene reine Fettsäuren in Form ihrer Kalisalze hinzugefügt und die Entfärbungszeiten gemessen. Die Resultate ergeben sich aus den Tabellen 1–3.

Ein Versuch, die *Menge der gebildeten Leucoform* mit derjenigen des *zugeetzten Substrates in Zusammenhang* zu bringen, ergab, dass z. B. in Anwesenheit von 80 ml 0,01 mol Kaliumstearatlösung mehr als 80 ml 0,01 mol Methylenblaulösung entfärbt wurden. Daraus musste zwangsläufig folgen, dass offenbar weiteres dehydrierbares Substrat im Reaktionsgemisch vorlag, da eine 100%ige Dehydrierung der zugefügten Stearinsäure nicht erwartet werden durfte.

Die *Aktivitätssteigerung* des Ferments durch *Nicotinamid, Pyridoxin, Pantothensäure, Vitamine der B-Gruppe*, wurde schon von E. Le Breton (23) beschrieben.

In einem Versuch prüften wir die Wirkung von Folsäure. Sie scheint den Fermentextrakt etwas zu aktivieren. Die Aktivitätssteigerung lässt sich jedoch nicht mit derjenigen des Adenosins vergleichen.

B) Experimentelles

a) Herstellung des Fermentextraktes

In einleitenden Versuchen wurde nach einer Methode gesucht, einen möglichst aktiven Fermentextrakt zu erhalten. Dabei fiel die Wahl auf eine Darstellungsmethode in Anlehnung an diejenige von *J. Champougny* und *E. Le Breton* (21), da mit dieser im Thunberg-Versuch Entfärbungszeiten von 1–2 Minuten zu erzielen waren, im Gegensatz zu 25 Minuten mit nach Langscher Methode hergestelltem Extrakt (9).

Die Ratten werden durch Decapitierung getötet, die Leber sofort herausgenommen und mit Eis gekühlt.

6 g Leber werden in einem Glashomogenisator nach *Elvehjem-Potter* (38) kurz verrieben und nach Zugabe von 10 ml 9% Kochsalz-Lösung weitere 1–2 Minuten in der Kälte homogenisiert. Das Gemenge wird quantitativ in ein Zentrifugenglas überführt, in einem Wasserbad innert 3 Minuten auf 37° erwärmt und sogleich in Eiswasser auf mindestens 5° abgekühlt. Bei dieser Temperatur wird das Glas in die auf –2° gekühlte Kältezentrifuge (MSE, Typ Mobil, Mod. P mit High-speed Winkelkopf) eingesetzt und 25 Minuten bei 4000 Touren zentrifugiert. Der Bodensatz wird verworfen (Zellreste, Gewebsreste etc.) und das Überstehende in ein neues auf 0° gekühl-

tes Zentrifugenglas überführt, durch Zugabe von 4,9 g kristallisiertem Ammoniumsulfat gefällt und 25 Minuten bei 4000 Touren und -2° zentrifugiert. Das Überstehende wird verworfen und der Rückstand in 10 ml Phosphatpuffer m/15, pH = 8,0 gelöst, nochmals mit 4,9 g kristallisiertem Ammoniumsulfat gefällt und weitere 25 Minuten zentrifugiert. Das Überstehende wird wieder verworfen und der Bodensatz in 10 ml Phosphatpuffer m/15, pH = 8,0 gelöst.

Der auf diese Weise gereinigte Extrakt wird auf Eis gestellt und innert 1–2 Stunden verbraucht. Wichtig ist, dass alle Operationen in der Kälte ausgeführt werden, da der Extrakt sonst merklich an Aktivität einbüsst.

b) Dehydrierungsversuche mit verschiedenen Fettsäuren

1. Apparatur

Die *Entfärbungsversuche* wurden, wenn nicht anders angegeben, alle in einer Apparatur nach K. Lang (9) ausgeführt. Sie bestand aus einem Glas-*rechen* mit 8 Schliffansätzen. Die dazu passenden Kolben wiesen einen Inhalt von 10 resp. 35 ml auf. Der Vorteil dieser Apparatur besteht darin, dass alle 8 Proben unter dem gleichen Vakuum stehen. Die Kolben wurden mit dem gleichen Volumen beschickt – Volumendifferenzen wurden durch Zugabe von Puffer ausgeglichen – an der Wasserstrahlpumpe evakuiert und in einen Wasserthermostat von 37° gehängt. Gemessen wurde die Zeit bis zur vollständigen Entfärbung des Methylenblaus.

2. Reagentien

Phosphatpuffer: nach Sörensen m/15, pH = 8,0.
Methylenblau: Methylenblau – medicinale (Sandoz) in wässriger Lösung 1 : 2000.
Adenosin: (Hoffmann- La Roche) in wässriger Lösung; 0,5 mg/ml; 0,1 ml Lösung = 50 γ .
Fettsäurelösungen: 0,01 m wässrige Lösungen der Kaliumsalze Palmitin-, Arachin- und Margarinsäure: Eastman Kodak Chemicals. Brassidinsäure durch Umlagerung aus Erucasäure nach C. Reimer (39) mit NO_2 . Elaidinsäure durch Umlagerung aus Ölsäure nach D. Swern (40) mit metallischem Selen. Die restlichen Säuren stammten aus der Institutssammlung. Wir kristallisierten alle Säuren mindestens zweimal aus Petroläther um, bis zum konstanten Smp; die Ölsäure reinigten wir durch Vakuum-Destillation.

3. Mengenverhältnisse pro Kölbchen

1 ml Fermentextrakt
1 ml Phosphatpuffer
1 ml Substrat
0,2 ml Methylenblau
0,1–0,15 ml Adenosinlösung.

Es zeigte sich, dass sich Blindproben ohne Substrat nach Zugabe von Adenosin auch entfärbten. Dies geschah jedoch nur, wenn zuviel Adenosin zugegeben wurde. Anhand von Reihenversuchen konnte festgestellt werden, dass die optimale Menge Adenosinlösung bei 0,1–0,15 ml liegt. Sie ist von Extrakt zu Extrakt verschieden und sollte vorher bestimmt werden.

c) Bestimmung der Menge entfärbten Methylenblaus

Reaktionsgemisch:

80 ml Leberextrakt nach Le Breton
80 ml K-Stearat m/100
80 ml Phosphatpuffer m/15 pH = 8,0
16 ml Methylenblau 1 : 2000
8 mg Adenosin
16 ml Na-Fumarat m/20

Die Fumaratzugabe erfolgte in Anlehnung an die Versuche von *Tatsu Koyanagi* und *Harunobu Noro* (34, 35). Das Reaktionsgemisch wurde in einer 500-ml-Birne in der Kälte evakuiert. Das Methylenblau entfärbte sich nach 3 Minuten im Thermostat von 38°. Danach wurde 5 ml-weise Methylenblaulösung 1 : 2000 zugegeben, bis keine Entfärbung mehr eintrat, was nach 45 ml der Fall war. Der Totalverbrauch an Methylenblaulösung betrug also 61 ml, was einer Menge von 0,0305 g, resp. 81,6 ml einer m/100 Methylenblaulösung entsprach. Würde man die Menge entfärbtes Methylenblau der Menge dehydrierter Säure gleichsetzen, so wäre hier sogar mehr Stearinsäure dehydriert worden, als überhaupt eingesetzt.

d) Aktivitätssteigerung des Ferments durch Folsäure

Es wurde noch die Wirkung von Folsäure untersucht:

Mengenverhältnisse:
1 ml Leberextrakt
1 ml Puffer

1 ml K-Behenat als Substrat
 0,2 ml Methylenblau 1 : 2000
 Folsäure in wässriger Lösung variiert.

Durch die Zugabe von 0,1 und 0,2 ml einer wässrigen Lösung (1 mg/2 ml) wurden Entfärbungszeiten von 16, resp. 22 Minuten erhalten. Die Aktivitätssteigerung des Extraktes lässt sich jedoch nicht mit der des Adenosins vergleichen.

Mit einer Lösung von 1 mg/10 ml liess sich die optimale Menge feststellen:

<i>ml Folsäurelösung:</i>	<i>Entfärbungszeit:</i>
0	keine Entfärbung
0,1	18'
0,2	10'
0,5	9'
1,0	14'
2,0	25'
3,0	keine Entfärbung

e) Herstellung von 2-Octadecensäure

Die Herstellung erfolgte nach *Myers* (41). Da die im Handel erhältliche 2-Bromstearinsäure sich bei der papierchromatographischen Kontrolle als äusserst unrein entpuppte, musste von Stearinsäure ausgegangen werden. Stearinsäure wird mit Brom in 2-Bromstearinsäure überführt und diese durch Kochen mit Kaliumjodid in Aethanol in 2-Jodstearinsäure umgewandelt. Als letzte Stufe erfolgt die Abspaltung von Jodwasserstoff mittels KOH. Die rohe Säure wurde durch Umkristallisieren aus Aethanol gereinigt. Smp. 58°. Literatur: 58,5–59°.

Die 2-Octadecensäure läuft auf dem Chromatogramm wesentlich langsamer als Ölsäure und nur wenig schneller als Stearinsäure, von der sie sich aus einem Gemisch fast nicht abtrennen lässt.

C) Diskussion der Ergebnisse

Aus den in den Tabellen 1–3 enthaltenen Angaben bzw. Entfärbungszeiten folgt, dass im Durchschnitt das Methylenblau nach Zugabe von Behenolsäure am schnellsten, nach Zugabe von Ölsäure am langsamsten entfärbt wird. Für alle übrigen geprüften Säuren sind die Befunde uneinheitlich. Wenn in diesen Fermentextrakten vor allem ein in Stellung 9,10 dehydrierendes Enzym er-

wartet werden soll, ist die kurze Entfärbungszeit für Behenolsäure wenig verständlich.

Die gesättigten Fettsäuren, also vor allem die Stearinsäure und die Palmitinsäure, deren Dehydrierung in Stellung 9,10 zu Öl- bzw. Palmitoleinsäure führen müßte, werden im Verhältnis zu den höher ungesättigten Säuren langsamer angegriffen. Es war daher anzunehmen, dass sich auch Dehydrierungen in α , β Stellung abspielen.

Der Nachweis von α , β -ungesättigten Säuren konnte indessen papierchromatographisch nach Herstellung von 2-Octadecensäure nicht erbracht werden, da sich letztere nicht aus einem Gemisch mit Stearinsäure abtrennen liess.

IV. DEHYDRIERUNG VON ^{14}C -STEARINSÄURE

A) Allgemeines

Wir untersuchten das Vorhandensein einer Fettsäuredehydrogenase in der Fermentanreicherung des Langschen Enzyms nach Le Breton, im Lebergesamthomogenat und in den Lebermitochondrien.

Die Gesamtlipide haben wir jeweils aus dem Reaktionsgemisch extrahiert und das aus den Zellen stammende Neutralfett mittels einer Silicagelsäule abgetrennt. Die freien Fettsäuren wurden oxydiert, die entstandenen Dicarbonsäuren papierchromatographiert und durch Auszählen der Chromatogramme identifiziert. Die Resultate sind aus Tabelle 4 ersichtlich.

Bei den ersten drei Versuchen (I-III) mit Ferment-Extrakt nach Le Breton und der Thunbergtechnik liess sich, trotz rascher Entfärbung des Methylenblaus im oxydativen Reaktionsgemisch, keine aktive Dicarbonsäure nachweisen. Wir vermuteten daher, das Ferment befinde sich vielleicht in den Mitochondrien.

Wir änderten die Versuchsbedingungen, indem wir das Reaktionsgemisch von nun an ohne Methylenblau unter Sauerstoff schüttelten, statt im Vakuum nach der Methode von Thunberg.

Das Ergebnis zweier Versuche mit Mitochondrien (IV und V) war wiederum negativ, so dass Zweifel aufkamen, ob mit der verwendeten Aufarbeitungsmethode eine Dehydrierung überhaupt nachgewiesen werden könne.

Um dies aufzuklären machten wir einen Versuch (VI) mit einem Lebergesamthomogenat, in der Hoffnung, dass sich hierin die Dehydrogenasen am ehesten nachweisen lassen würden. Jetzt enthielt das Oxydationsprodukt eine Spur aktiver Azelainsäure. Aus dem zweiten Versuch (VII) mit Lebergesamthomogenat liess sich bei Zugabe von ATP als Aktivator zum Reaktionsgemisch, eine stark radioaktive Azelainsäure isolieren. Die enzymatische Aktivierung durch ATP wurde hieraus deutlich ersichtlich. Wir wiederholten deshalb die vorhergehenden Versuche mit den Leberhomogenatfraktionen mit Zusatz von ATP.

Wir stellten nochmals Lebermitochondrien her, untersuchten diesmal jedoch sowohl die Mitochondrienfraktion (VIIIb) als auch die Fraktion des Überstehenden (VIIIa) (Mikrosomen, Cytoplasma etc.) auf das Vorhandensein des Enzyms. Es ist allem Anschein nach in der letzteren Fraktion enthalten. Mit dem Le Bretonschen Extrakt (IX) liess sich auch bei Zugabe von ATP,

Tabelle IV

Dehydrierung von Stearinsäure durch Leberhomogenat

Versuchs- Nummer	Art des Leberextraktes	Aktivitäten in c/mg min	
		Fettsäuren v. Oxyd.	Azelain- säure
	<i>A) im Vakuum (Thunbergmethode)</i>		
I	nach Le Breton	22340	keine
II	nach Le Breton	203000	keine
III	nach Le Breton	120200	keine
	<i>B) in Gegenwart von Sauerstoff</i>		
IV	Mitochondrien	81400	keine
V	Mitochondrien	77100	keine
VI	Gesamthomogenat	17350	95,8
	<i>mit ATP-Zusatz</i>		
VII	Gesamthomogenat	22200	3380
VIIIa	Überstehendes	16200	534
VIIIb	Mitochondrien	27800	22,0
IX	nach Le Breton	14500	keine
Xa	Überstehendes nach 1. Ammonsulfatfällung	31800	87,2
Xb	Extrakt nach Le Breton	24300	14,4

Die Aktivitäten wurden im Flow-Counter gemessen oder auf die entsprechenden Werte umgerechnet.

statt Adenosin, und unter Sauerstoff geschüttelt, nicht die geringste Spur einer Aktivität in der Azelainsäure feststellen.

Es lag nun auf der Hand, die Fraktion des Leberhomogenates zu untersuchen, die bei der Le Bretonschen Fermentanreicherung im Zuge der Reinigung verworfen wird, also das Überstehende nach dem ersten Zentrifugieren mit Ammoniumsulfat (Xa). Es zeigte sich, dass dieses eine geringe, jedoch sehr deutliche Fähigkeit besitzt, Stearinsäure zu Öläure zu dehydrieren.

B) Experimentelles

a) Tiermaterial

Wir verwendeten durchwegs Lebern von gesunden, normal ernährten weissen weiblichen Ratten aus dem Inzuchtstamm des schweizerischen Vitamininstitutes. Ihr Alter betrug durchschnittlich 1 Jahr und ihr Gewicht ca. 250 g, das Lebergewicht war 8–10 g.

b) Herstellung der Fermentextrakte

Sie erfolgte im allgemeinen nach *Le Breton und Mitarbeitern* (21) bzw. nach *Hogeboom und Mitarbeitern* (43) und ist für die ausgeführten Versuche detailliert beschrieben (siehe unten).

c) Synthese der ^{14}C -Carboxyl-signierten Stearinsäure

Die Stearinsäure wurde aus Heptadecylbromid, erhalten durch Silbersalzabbau von Stearinsäure (44) über eine Grignard-Verbindung mit ^{14}C -Kohlendioxyd synthetisiert [siehe auch Calvin (45)].

Ein mit Kühler versehener 150 ml Dreihalskolben mit 80 mg Magnesiumspänen und einem Magnetrührer wird zwei Stunden am Hochvakuum getrocknet. Man lässt getrocknete Luft (durch ein Phosphorpentoxyd-Rohr) einströmen, verschliesst den Kolben mit einem Calciumchlorid-Rohr und gibt 1,05 g Heptadecylbromid hinzu. Die Luft wird durch 10 Minuten dauerndes Einleiten von Stickstoff verdrängt. Nach Zugabe von 45 ml absolutem Äther durch den Kühler beginnt das Gemisch zu reagieren. Nach 1½stündiger

Reaktionsdauer wird der Kolben mit der Grignard-Verbindung mit flüssiger Luft gekühlt und mit Schliffpfropfen verschlossen. Die Apparatur wird ausgepumpt und die flüssige Luft durch ein Acetontrockeneisgemisch von -20°C ersetzt. Jetzt werden im Kohlendioxyd-Entwicklungskolben 300 mg Bariumcarbonat mit 10 ml Schwefelsäure (80 % conc. Schwefelsäure + 20 % Oleum) umgesetzt, und der Kolben nochmals mit flüssiger Luft abgekühlt. Das Reaktionsgemisch wird $1\frac{1}{2}$ Stunden, unter langsamem Ansteigenlassen der Temperatur bis $+20^{\circ}\text{C}$, gerührt.

Aufarbeitung: Die Ätherlösung wird mit verdünnter Schwefelsäure ausgewaschen, bis sie klar geworden ist. Der Äther wird abdestilliert und der Rückstand nach Zugabe von 30 %iger KOH 20 Minuten gekocht und nach dem Erkalten zweimal mit Petroläther ausgeschüttelt. Man säuert die Lösung an, schüttelt sie dreimal mit Petroläther aus, wäscht diesen mit Wasser neutral und dampft, nach Trocknen über Natriumsulfat, ein.

Ausbeute 400 mg = 91,6 % d. Th., bezogen auf Bariumcarbonat. Smp. $69,5-70^{\circ}$.

Reinheit: Das Papier-Chromatogramm zeigte keine Verunreinigung. Erst wenn es mit 800 γ Säure bis fast an die Grenze der Auflösung beladen wurde, war eine Spur einer schneller laufenden Säure – Palmitinsäure – zu sehen. Beim Auszählen liess sich jedoch eine Verunreinigung von rund 6 % Palmitinsäure feststellen. Ungesättigte Fettsäuren waren keine vorhanden, wie durch Permanganatentwicklung des Chromatogramms festgestellt werden konnte.

Da die signierte Stearinsäure nur in kleinen Mengen verfügbar war, mußte sie jeweils zurückgewonnen und wieder gereinigt werden. Daraus läßt sich die Abnahme der Substrataktivität bei den verschiedenen Versuchen erklären.

d) Aufarbeitung des Reaktionsgemisches

1. Extraktion der Lipide und Fettsäuren aus dem Reaktionsgemisch

Nach Beendigung der Versuche wurde mit verdünnter Schwefelsäure (10 %ig) angesäuert (bis kongosauer), mit dem gleichen Volumen Aceton versetzt und $\frac{1}{2}$ bis 1 Stunde stehengelassen. Das Aceton erneuerten wir mehrmals und filtrierten es schliesslich vom Rückstand ab. Letzterer wurde zuerst mit Aceton, dann mit Äther, mehrere Stunden im Soxhlet extrahiert. Aus den Aktivitätsmessungen ging hervor, dass bei öfterem Acetonwechsel nur noch sehr geringe Fettmengen im Rückstand verblieben.

Die Aceton- und Ätherextrakte wurden in einem 2-Liter-Rundkolben vereinigt und die Lösungsmittel im Vakuum im Wasserbad schonend abdestilliert. Die zurückbleibende wässrige Phase wurde mit Petroläther dreimal ausgeschüttelt und dann noch 20–24 Stunden mit Äther im Rührextraktor extrahiert. Die beiden Extrakte wurden je für sich mit Wasser neutral gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Im Ätherextrakt befanden sich meist nur noch Spuren aktiver Substanz.

2. Trennung der Leberlipide von den Fettsäuren

Im obigen Rückstand befinden sich ausser der eingesetzten Säure und dem Reaktionprodukt noch große Mengen Leberlipide. Beim Verseifen des ganzen Rückstandes wurden die eingesetzte Säure und ihr Dehydrierungsprodukt zu stark durch die entsprechenden inaktiven Leberfettsäuren verdünnt, was sich bei schwacher Aktivität des Substrates durch sehr merkliche Verringerung der Stosszahl auswirkte. Es musste deshalb nach einer Methode zur Abtrennung der Lipide von den Fettsäuren gesucht werden.

Nachdem ein Trennungsversuch auf einer Alox-Säule unbefriedigende Resultate ergab, verwendeten wir eine Silicagelsäule in Anlehnung an Kaufmann (42)

Säule: 1,9 cm ϕ , 15–20 cm hoch mit Silicagel gefüllt, je nach Menge zu trennendem Gemisch. Das Silicagel „Ciba“ wurde in der Microschlagmühle mit einem Einsatzsieb von 0,9 mm Lochdurchmesser fein vermahlen und 1 Stunde bei 180° im Vakuum getrocknet.

Das Fettsäuregemisch wurde in wenig Trichloräthylen (techn., stab., 1 Mal destilliert) gelöst, auf die mit Silicagel beschickte Säule gebracht und mit reichlich Trichloräthylen nachgewaschen. Das Fett wurde dabei ausgewaschen und die Fettsäuren blieben quantitativ auf der Säule zurück.

Wir überführten den Säuleninhalt quantitativ in einen Soxhlet und extrahierten mit reinem Aceton über Nacht. Wir dampften die Acetonlösung ein und verseiften die so erhaltenen Fettsäuren, noch mit einer Spur Lipide verunreinigt, mit 30%iger methanolischer Kalilauge 2 Stunden unter Stickstoff. Nach Abtrennen des Unverseifbaren mit Petroläther säuerten wir mit 50%iger Schwefelsäure an und schüttelten die Fettsäuren mit Petroläther aus. Der Petrolätherextrakt wurde neutral gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft.

Anhand von ausgezählten Fettsäure-, sowie Lipidchromatogrammen konnte folgendes über den Grad der Trennung ausgesagt werden:

1. Die Fettsäuren wurden sozusagen quantitativ vom Neutralfett abgetrennt und blieben auf der Säule. In dem durch die Säule gelaufenen Neutralfett waren kaum messbare Mengen mehr an Fettsäuren enthalten.
2. Trotz längerem Nachwaschen mit reinem Lösungsmittel blieben immer noch merkliche Spuren Neutralfett auf der Säule zurück. Es zeigte sich ferner, dass um so mehr Neutralfett auf dem Silicagel haften blieb, je feiner dieses war.

3. Oxydation der Fettsäuren

Sie erfolgte nach E. von Rudloff (46) mit Natrium-meta-Perjodat. Das Reaktionsgemisch wurde nach 20 Stunden mit 10% Schwefelsäure angesäuert bis kongosauer und mit Schwefeldioxyd-Gas gesättigt bis die Lösung farblos wurde. Nach Absaugen des überschüssigen Schwefeldioxyds am Vakuum wurden die Fettsäuren dreimal mit Petroläther ausgeschüttelt und dieser neu-

tral gewaschen. Das Waschwasser wurde mit der wässrigen Lösung der Oxydationsprodukte vereinigt und 24 Stunden mit Äther im Röhrextraktor extrahiert. Die Ätherlösung wurde über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft.

4. Papierchromatographie der Fettsäuren und Dicarbonsäuren

Wir chromatographierten die *Fettsäuren* auf 2043 b (Schleicher & Schüll) in Eisessig-Kohlenwasserstoff (47). Anfangs wurde ungewaschenes, später fast nur noch gewaschenes Papier verwendet, da dieses wesentlich sauberer trennte dazu noch in kürzerer Zeit. Die Bögen (14 x 40 cm) wurden im Mittel mit 1100 mg Kohlenwasserstoff besprüht und bis maximal 40 Stunden laufen gelassen. Die *Dicarbonsäuren* im Oxydationsprodukt wurden nach *Isherwood* (48) mit n-Propanol-Ammoniak ($d = 0,880$) = 70 : 30 (v/v) chromatographiert. Wir verwendeten Papier Nr. 2040 a (Schleicher & Schüll) und für größer aufgetragene Substanzmengen 2043 b gewaschen und ungewaschen. Die Substanz (das erhaltene Oxydationsprodukt) wurde jedoch als freie Säure und nicht als Natriumsalz aufgetragen. Laufzeit im Mittel 14 Stunden, absteigend. Wir entwickelten durch Besprühen mit Universalindikator „Merck“, der mit Natronlauge alkalisch gemacht worden war. Die Ammoniumsalze der Säuren traten hierbei als rote Flecken auf. Zur Kontrolle wurde immer ein Gemisch bekannter Dicarbonsäuren mitlaufen gelassen.

e) Dehydrierungsversuche

1. Versuche nach der Methylenblautechnik mit Leberextrakten nach Le Breton (Versuche I, II und III).

Versuch I

Leberextrakt:

Fermentextrakt nach Le Breton aus 30 g Leber

Mengenverhältnisse

100 ml Extrakt

100 ml Phosphatpuffer m/15 pH = 8,0

6 mg Adenosin

8 ml Methylenblaulösung m/100

25 ml K-Seife m/100

Reaktionsgemisch

Das Reaktionsgemisch wurde in eine 500-ml-Birne gebracht, diese evakuiert und bei 37° im Thermostat geschüttelt. Die Entfärbung trat nach

3 Minuten ein, der Kolben wurde noch weitere 20 Minuten im Wasserbad gelassen. Es wurden vier Ansätze gemacht, diese dann nach Reaktionsende vereinigt.

Aufarbeitung

Wir erhielten:

2100 mg Lipid/Fettsäuregemisch

600 mg Fettsäuren nach der Silicageltrennung

Die Fettsäuren wurden nicht verseift, sondern direkt oxydiert.

Die Dicarbonsäuren zeigten auf dem Flowcounter ausgezählt *keine* Aktivität.

Versuch II

Leberextrakt:

Fermentextrakt nach Le Breton aus 30 g Leber

Mengenverhältnisse

100 ml Extrakt

100 ml Phosphatpuffer m/15 pH = 8,0

8 ml Methylenblaulösung m/100

6 mg Adenosin

25 ml K-Stearat m/100

Reaktionsgemisch

Es wurden vier Ansätze gemacht und diese dann nach Reaktionsende vereinigt. Die Entfärbungszeit betrug 4 Minuten.

Aufarbeitung

Wir erhielten:

3900 mg Lipid/Fettsäuregemisch

700 mg Fettsäuren nach der Silicageltrennung

350 mg Fettsäuren nach der Verseifung.

Ein Teil der Fettsäuren wurde oxydiert, die Dicarbonsäuren chromatographiert und ausgezählt. Die Dicarbonsäuren zeigten *keine* Aktivität.

Versuch III

Leberextrakt:

Fermentextrakt nach Le Breton aus 60 g Leber

Mengenverhältnisse

200 ml Extrakt

200 ml Phosphatpuffer m/15 pH = 8,0

16 ml Methylenblaulösung m/100
12 mg Adenosin
40 ml K-Stearat m/100

Reaktionsgemisch

Es wurden zwei Ansätze gemacht, diese dann nach Reaktionsende vereinigt. Die Entfärbungszeit betrug 4 Minuten.

Anfarbeitung

Aus der Überlegung, dass Fermente beide Richtungen der Reaktion katalysieren, und es somit hätte möglich sein können, dass bei Zutritt von Luft zum Reaktionsgemisch die Dehydrierungsreaktion in umgekehrter Richtung verlief, wurde der Kolben nach Reaktionsende noch unter Vakuum in siedendem Wasser erhitzt, bis das Eiweiss koagulierte und man annehmen konnte, das Ferment sei dadurch sicher inaktiviert.

Anfarbeitung

Wir erhielten:

1600 mg Lipid/Fettsäuregemisch
360 mg Fettsäuren nach der Silicageltrennung
250 mg Fettsäuren nach der Verseifung

Ein Teil der Fettsäuren wurde oxydiert, die Dicarbonsäuren chromatographiert und ausgezählt. Die Azelainsäure zeigte *keine* Aktivität.

2. Versuche mit Mitochondrien (Versuche IV und V)

Versuch IV

Leberextrakt

Mitochondrienisolierung nach *Hogeboom & Schneider* (43)

30 g Leber wurden in 3 Portionen (also je 10 g) mit je 90 ml 0,88 m Rohruckerlösung im Potter homogenisiert, über 10 ml 0,88 m Rohruckerlösung überschichtet und bei 600 g (2100 Touren) 10 Minuten in der Kältezentrifuge bei -3° zentrifugiert zur Abtrennung von Geweberesten und noch unzerstörten Zellen. Das Überstehende wurde in ein neues Zentrifugenglas überführt und weitere 10 Minuten bei 600 g zentrifugiert; die gleiche Prozedur wiederholten wir noch einmal. Den Inhalt verteilten wir nun auf 6 Zentrifugengläser – wegen deren kleinerem Fassungsvermögen – und zentrifugierten 20 Minuten bei 18000 g (12690 Touren) und 4° . Das Überstehende wurde verworfen, der Bodensatz in 0,88 m Rohruckerlösung aufgeschlämmt und wieder 20 Minuten bei 18000 g zentrifugiert. Das Überstehende wurde wiederum verworfen. Die auf diese Weise gereinigten Mitochondrien fassten wir aus jeweils zwei Gläsern zusammen und schlämten sie in 50 ml Phosphatpuffer von pH = 8,0 auf.

Mengenverhältnisse

8 ml m/100 K-Stearat
50 ml Puffer, in dem die Mitochondrien von 10 g Leber aufgeschlämmt waren.

Reaktionsgemisch

Es wurden drei Parallelansätze gemacht. Jeden Ansatz füllten wir in einen 200-ml-Erlenmeyer, gaben Sauerstoff aus der Bombe zu, verschlossen ihn mit einem Gummizapfen und schüttelten $2\frac{1}{2}$ Stunden im Wasserbad von 37° . Nach Reaktionsende wurden die Ansätze vereinigt und zusammen aufgearbeitet.

Aufarbeitung

Wir erhielten:

200 mg Lipid/Fettsäuregemisch
100 mg Fettsäuren nach der Silicageltrennung
80 mg Fettsäuren nach der Verseifung.

Ein Teil der Fettsäuren wurde oxydiert, die Dicarbonsäuren chromatographiert und im Flow-Counter ausgezählt. Es war *keine* Aktivität der Dicarbonsäureflecken festzustellen.

Versuch V

Leberextrakt

90 g Rattenleber wurden in drei Portionen zu je 30 g im Glas-homogenisator in je 90 ml 0,25 m eisgekühlter Rohrzuckerlösung homogenisiert, zweimal 15 Minuten bei 600 g (2100 Touren) und einmal 5 Minuten bei 1500 g (3200 Touren) in der Kältezentrifuge bei -3° zentrifugiert, wobei der Bodensatz immer verworfen wurde. Den auf diese Weise gereinigten Extrakt zentrifugierten wir 20 Minuten bei 18000 g (12600 Touren) bei 4° , warfen das Überstehende und homogenisierten die sedimentierten Mitochondrien mit neuer 0,25 m Rohrzuckerlösung im Potter; dann wurde nochmals 20 Minuten bei 18000 g zentrifugiert.

Wir nahmen die Mitochondrien der sämtlichen Portionen zusammen in 70 ml 0,25 m Rohrzuckerlösung auf, homogenisierten im Potter und stellten sie für den Versuch bereit.

Mengenverhältnisse

140 ml KCl 0,15 m
14 ml $MgCl_2$ 0,15 m
28 ml Phosphatpuffer 0,15 m, pH = 7,6
70 ml Mitochondriensuspension
28 ml K-Stearat m/100
14 ml Trockenplasmalösung (1 g/10 ml HOH)

Die Verwendung von 0,25 m Rohrzuckerlösung ist an die Versuche von K. Felix (49) über die Dehydrase-Aktivität der Mitochondrien verschiedener Organe angelehnt. Das Trockenplasma sollte als Schutzkolloid wirken, zur Verhütung des Auskristallisierens der Stearinsäure.

Reaktionsgemisch

Der Ansatz wurde auf 14 50-ml-Erlenmeyer verteilt und diese in Gegenwart von Sauerstoff zwei Stunden in einem Wasserbad von 37° geschüttelt. Nach Reaktionsende wurden die Portionen wieder vereinigt und zusammen aufgearbeitet.

Aufarbeitung

Wir erhielten:

350 mg Lipid/Fettsäuregemisch

130 mg Fettsäuren nach der Silicageltrennung

100 mg Fettsäuren nach der Verseifung

Ein Teil der Fettsäuren wurde oxydiert, die Dicarbonsäuren chromatographiert und im Flow-Counter ausgezählt. Es war *keine* Aktivität der Dicarbonsäureflecken festzustellen.

3. Dehydrierungen mit Gesamthomogenat aus Leber (Versuche VI und VII)

Versuch VI

Leberextrakt

30 g Leber wurden in 100 ml eisgekühlter 0,25 m Rohrzuckerlösung im Potter homogenisiert und 15 Minuten bei 600 g (2100 Touren) bei -3° zentrifugiert zur Abtrennung der Gewebereste etc. Der Bodensatz wurde verworfen und das Überstehende verwendet.

Mengenverhältnisse

100 ml Homogenat

100 ml KCl 0,15 m

250 ml Phosphatpuffer 0,15 m, pH = 7,6

10 ml MgCl₂ 0,15 m

20 ml K-Stearat m/100

20 ml Trockenplasmalösung (1 g/10 ml HOH)

1,4 g Nicotinamid

Reaktionsgemisch

Der Ansatz wurde auf vier 200-ml-Erlenmeyer aufgeteilt und in Gegenwart von Sauerstoff zwei Stunden bei 37° geschüttelt. Die Portionen wurden nach Reaktionsende wieder vereinigt und zusammen aufgearbeitet.

Aufarbeitung

Wir erhielten:

850 mg Lipid/Fettsäuregemisch

400 mg Fettsäuren nach der Silicageltrennung

250 mg Fettsäuren nach der Verseifung

Ein Teil der Fettsäuren wurde oxydiert, die Dicarbonsäuren chromatographiert und auf dem Flow-Counter ausgezählt. Erstmals wird eine Aktivität des Azelainsäureflecks festgestellt. Beim Auftragen von 500 γ Oxydationsprodukt konnte folgende Aktivität des Azelainsäureflecks gemessen werden: 47,9 c/min.

Versuch VII

Leberextrakt

Siehe Versuch VI.

Mengenverhältnisse

100 ml Homogenat

100 ml KCl 0,15 m

200 ml Phosphatpuffer 0,15 m pH = 7,6

10 ml $MgCl_2$ 0,15 m

20 ml K-Stearat m/100

20 ml Trockenplasmalösung (1 g/10 ml HOH)

1,65 g Nicotinamid

0,093 g ATP

Bezogen auf den ganzen Ansatz von 450 ml sind Nicotinamid 0,03 molar und ATP 0,0005 molar

Reaktionsgemisch

Der Ansatz wurde auf vier 200-ml-Erlenmeyer aufgeteilt und in Gegenwart von Sauerstoff zwei Stunden bei 37° geschüttelt. Die Portionen wurden nach Reaktionsende wieder vereinigt und zusammen aufgearbeitet.

Aufarbeitung

Wir erhielten:

950 mg Lipid/Fettsäuregemisch

400 mg Fettsäuren nach der Silicageltrennung

230 mg Fettsäuren nach der Verseifung

Ein Teil der Fettsäuren wurde oxydiert, die Dicarbonsäuren chromatographiert und ausgezählt. Die Aktivität des Azelainsäureflecks war so stark, dass das Chromatogramm auf dem Automat ausgezählt werden konnte.

Beim Auftragen von 500 γ Oxydationsprodukt konnte folgende Aktivität des Azelainsäureflecks gemessen werden:

auf dem Automat: 297 c/min

auf dem Flow-Counter: 1691 c/min

Auch beim Auszählen eines Chromatogramms der verseiften Fettsäuren auf dem Automat zeigte sich eine deutliche Zunahme der Aktivität des Palmitinsäureflecks um rund 5%. Da Ölsäure auf dem Chromatogramm gleich schnell läuft wie Palmitinsäure, war anzunehmen, dass es sich bei der Zunahme um während der Reaktion entstandene Ölsäure handelt. Das Auszählen eines Chromatogramms der oxydierten Fettsäuren zeigte Verschwinden dieser Aktivitätszunahme und Rückkehr zum ursprünglichen Aktivitätsverhältnis der beiden Flecken.

4. Dehydrierungen mit Mitochondrien und Überstehendem (Versuch VIII)

Versuch VIII

Leberextrakt

30 g Leber wurden in 90 ml 0,25 m eiskalter Rohrzuckerlösung im Glas-homogenisator homogenisiert, 10 Minuten bei 600 g (2100 Touren) bei -3° und nach Verwerfen des Bodensatzes weitere 15 Minuten bei 9000 g (9000 Touren) bei 4° zentrifugiert.

Wir setzten das Überstehende (VIIIa) und die auf diese Weise gewonnenen Mitochondrien (VIIIb) in zwei getrennten Parallelversuchen ein. Die Mitochondrien wurden noch zur weiteren Reinigung in 80 ml 0,25 m Rohrzuckerlösung im Glashomogenisator aufgeschlämmt, 15 Minuten bei 10 000 Touren zentrifugiert und schliesslich mit 50 ml 0,25 m Rohrzuckerlösung homogenisiert.

Mengenverhältnisse

100 ml Puffer 0,15 m pH = 7,6

20 ml K-Stearat m/100

5 ml MgCl_2 0,15 m

50 ml KCl 0,15 m

10 ml Trockenplasmalösung (1 g/10 ml)

50 ml Überstehendes resp. Mitochondriensuspension

0,0997 g ATP

1,733 g Nicotinamid

Reaktionsgemisch

Jeder Versuch wurde auf zwei Erlenmeyer aufgeteilt und in Gegenwart von Sauerstoff 2 Stunden bei 37° geschüttelt. Die Portionen wurden nach Reaktionsende wieder vereinigt und jeder Versuch für sich aufgearbeitet.

Aufarbeitung

Beim Versuch VIIIa (Überstehendes) erhielten wir folgende Mengen:

300 g Lipid/Fettsäuregemisch

150 mg Fettsäuren nach der Silicageltrennung

110 mg Fettsäuren nach der Verseifung

Ein Teil der Fettsäuren wurde oxydiert, die Dicarbonsäuren chromatographiert und ausgezählt. Der Azelainsäurefleck war aktiv. Beim Auftragen von 500 γ Oxydationsprodukt konnten wir folgende Aktivität des Azelainsäureflecks messen (Flow-Counter): 267 c/min. Beim Auszählen eines Chromatogramms der verseiften Fettsäuren auf dem Automat zeigte sich eine deutliche Zunahme der Aktivität des Palmitinsäureflecks um rund 3 %, die nach dem Oxydieren der Fettsäuren wieder verschwand.

Beim Versuch VIIIb (Mitochondrien) wurden folgende Mengen erhalten:

100 g Lipid/Fettsäuregemisch

80 mg Fettsäuren nach der Silicageltrennung

50 mg Fettsäuren nach der Verseifung

Ein Teil der Fettsäuren wurde oxydiert, die Dicarbonsäuren chromatographiert und ausgezählt. Der Azelainsäurefleck war aktiv, jedoch wesentlich geringer als beim Versuch mit der überstehenden Fraktion.

Beim Auftragen von 500 γ Oxydationsprodukt konnte folgende Aktivität des Azelainsäureflecks im Flow-Counter gemessen werden: 11 c/min. Beim Auszählen des Chromatogramms der verseiften Fettsäuren auf dem Automat liess sich innerhalb der Fehlergrenze keine deutliche Zunahme der Palmitinsäurefleck-Aktivität feststellen.

5. Dehydrierungen wie Versuche I, II und III aber in Gegenwart von Sauerstoff (Versuch IX und X)

Versuch IX

Leberextrakt

Fermentextrakt nach Le Breton aus 30 g Leber

Mengenverhältnisse

100 ml Extrakt

100 ml Phosphatpuffer pH = 8,0 m/15

50 ml KCl 0,3 m

10 ml $MgCl_2$ 0,15 m

20 ml K-Stearat m/100

0,058 g ATP

1,03 g Nicotinamid

Reaktionsgemisch

Der Ansatz wurde auf zwei Erlenmeyer aufgeteilt, diese in Gegenwart von Sauerstoff 2 Stunden bei 37° geschüttelt. Die Portionen wurden nach Reaktionsende wieder vereinigt und zusammen aufgearbeitet.

Aufarbeitung

Wir erhielten:

600 mg Lipid/Fettsäuregemisch

350 mg Fettsäuren nach der Silicalgeltrennung

150 mg Fettsäuren nach der Verseifung

Ein Teil der Fettsäuren wurde oxydiert, die Dicarbonsäuren chromatographiert und ausgezählt. Der Azelainsäurefleck zeigte *keine* Aktivität.

Versuch X

Leberextrakt

Fermentextrakt nach Le Breton aus 30 g Leber. Das Überstehende von der ersten Fällung mit Ammoniumsulfat wurde jedoch nicht verworfen, sondern in einem Versuch eingesetzt (Xa) (Le Bretonsche Anreicherung: Xb).

Mengenverhältnisse

100 ml Phosphatpuffer pH = 7,6 0,15 m

50 ml KCl 0,15 m

5 ml MgCl₂ 0,15 m

50 ml Überstehendes, resp. Le Bretonsche Anreicherung (gelöst in Phosphatpuffer pH = 8,0 m/15)

20 ml K-Stearat m/100

10 ml Trockenplasma (1 g/10 ml HOH)

0,825 g Nicotinamid

0,0465 g ATP

Reaktionsgemisch

Jeder Versuch wurde auf zwei Erlenmeyer aufgeteilt und diese in Gegenwart von Sauerstoff zwei Stunden bei 37° geschüttelt. Die Portionen wurden nach Reaktionsende wieder vereinigt und jeder Versuch für sich aufgearbeitet.

Aufarbeitung

Beim Versuch Xa (Überstehendes) wurden folgende Mengen erhalten:

150 mg Lipid/Fettsäuregemisch

100 mg Fettsäuren nach der Silicageltrennung

80 mg Fettsäuren nach der Verseifung

Ein Teil der Fettsäuren wurde oxydiert, die Dicarbonsäuren chromatographiert und ausgezählt. Der Azelainsäurefleck war *schwach aktiv*. Beim

Auftragen von 500 γ Oxydationsprodukt konnte folgende Aktivität des Azelainsäureflecks im Flow-Counter gemessen werden: total 43,6 c/min.

Beim Versuch Xb (Le Bretonsche Anreicherung) wurden folgende Mengen erhalten:

250 mg Lipid/Fettsäuregemisch

150 mg Fettsäuren nach Silicalgeltrennung

100 mg Fettsäuren nach Verseifung

Ein Teil der Fettsäuren wurde oxydiert, die Dicarbonsäuren chromatographiert und ausgezählt.

Beim Auftragen von 500 γ Oxydationsprodukt konnte folgende Aktivität des Azelainsäureflecks im Flow-Counter ausgemessen werden: 7,2 c/min.

Es wurden drei verschiedene Chromatogramme ausgezählt mit etwa dem gleichen Resultat.

Bemerkungen zu diesem Versuch:

Die Azelainsäure, gewonnen aus dem Reaktionsgemisch mit dem Überstehenden, das von Le Breton bei ihrer Fermentreinigung verworfen wird, besitzt eine geringe, jedoch sehr deutliche Aktivität. Die Azelainsäure, gewonnen aus ihrer Anreicherung, ist hingegen kaum aktiv. Die Spur Aktivität im letzteren Fall ist wahrscheinlich durch Verunreinigung des Le Bretonschen Extraktes mit Überstehendem eingeschleppt worden. Bei der Extrakt-herstellung verlief die erste Fällung mit Ammoniumsulfat sehr gut, das Überstehende war eine klare Lösung. Die zweite Fällung ging nicht so gut, trotz wiederholtem Zentrifugieren wollte der Extrakt nicht vollständig sauber sedimentieren, er könnte also etwas mit dem zweiten Überstehenden (was nach Le Breton auch verworfen wird) verunreinigt sein. Die Aktivitätsprobe im Thunbergversuch nach der zweiten Fällung zeigt

Extrakt + Adenosin + Substrat (K-Stearat) Entfärbung: 11'

Extrakt – Adenosin + Substrat keine

Extrakt + Adenosin – Substrat keine

Nach Le Breton ist der Extrakt also rein, da zur Entfärbung sowohl Substrat, als auch Adenosin notwendig sind.

C) Diskussion der Ergebnisse

Aus den mitgeteilten Versuchen kann folgendes festgehalten werden:

1. Die Befunde von Lang, Le Breton und Mitarbeitern, dass die Entfärbung von Methylenblau durch nach angegebenem Verfahren erhaltene Ferment-extrakte aus Leber als Dehydrierung zugefügter Fettsäure gewertet werden kann, sind mit starken Vorbehalten behaftet. Die rasche Entfärbung konnten wir in allen Fällen bestätigen, aber bei keinem der drei Versuche mit Extrakt nach Le Breton und dem Thunberg-Verfahren aktive Azelainsäure nachweisen. Letztere müsste nach Oxydation des Reaktions-

gemisches aus der Ölsäure sich bilden, die ihrerseits aus der zugefügten ^{14}C -Stearinsäure entstanden wäre.

2. Ein in Rohrzuckerlösung hergestelltes Leberhomogenat vermag, nach Abtrennen der Zellkerne etc., *unfraktioniert* Stearinsäure im Ausmass von etwa 5 % in Ölsäure zu dehydrieren.
3. Mit dem gleichen Extrakt, fraktioniert in Mitochondrien und Überstehendes (Mikrosomen, Cytoplasma etc.) erhielten wir folgende Resultate: Das Überstehende wandelt Stearinsäure im Ausmasse von etwa 3 %, die Mitochondrien nur zu weniger als 0,5 % in Ölsäure um.

Dass die Mitochondrien eben noch Dehydrase-Aktivität zeigen, beruht wohl auf einer geringen Verunreinigung durch Überstehendes. Um diesen Fehler auszuschalten, müsste man erstere nicht nur einmal, sondern mehrmals mit Rohrzuckerlösung auswaschen, allerdings auf die Gefahr hin, sie durch solche Manipulationen bereits zu schädigen.

Es kann deshalb mit grösster Wahrscheinlichkeit ausgesagt werden, dass sich die Dehydrasen nicht in den Mitochondrien, sondern im Überstehenden, d. h. in den Mikrosomen und dem Cytoplasma befinden.

4. Aus dem Resultat der letzten beiden Versuche (IX und X) mit dem Le Bretonschen Fermentextrakt darf man schließen, dass sich in dieser „Anreicherung“ überhaupt keine 9,10-Fettsäuredehydrase befindet. Sie kommt vielmehr in der Fraktion vor, die von Le Breton im Verlaufe der Reinigung des Fermentextraktes verworfen wird, nämlich im Überstehenden nach dem Zentrifugieren mit Ammonsulfat. Da bei Versuch IX nach der Oxydation der Reaktionsprodukte keine aktive Azelainsäure isoliert werden konnte, ist anzunehmen, dass die nur minimale Aktivität der Azelainsäure bei Versuch Xb auf eine geringe Verunreinigung jenes Fermentextraktes durch Überstehendes zustande kommt. Ganz deutlich ist jedoch ersichtlich, dass auch das Überstehende nach dem Verfahren von Le Breton die Dehydrase in viel geringerem Ausmasse enthält als etwa der in anderer Weise fraktionierte Leberextrakt. Dass die Le Bretonschen Fermentextrakte Methylenblau entfärben, ist zweifellos gesichert. Die Dehydrierung führt aber nicht zu in Stellung 9,10 ungesättigten Säuren. Die zugesetzten höheren Fettsäuren haben vielleicht lediglich die Eigenschaft, andere im Extrakte vorliegende Dehydrasen zu katalysieren.

V. EINBAU DER ^{14}C -STEARINSÄURE IN NEUTRALFETT UND PHOSPHATIDE DES LEBERHOMOGENATES

Es schien uns wichtig, das Schicksal der den Fermentextrakten zugeführten Stearinsäure nicht nur im Hinblick auf die Dehydrierung zu verfolgen, sondern auch einen möglichen Einbau in die Zell-Lipide zu untersuchen.

Zu diesem Zweck haben wir die aus dem Reaktionsgemisch extrahierten Gesamtlipide papierchromatographiert (47) und dabei festgestellt, dass 97 % der Gesamtaktivität in den Fettsäuren und 2,7 % in den Phosphatiden vorhanden war. Nach Abtrennen der Fettsäuren durch Chromatographie an Silicagel und Papierchromatographie der Fettsäure-freien Lipidfraktion fanden wir 86 % der Aktivität im Phosphatidflecken und 14 % im Neutralfett.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Durch die vorliegende Arbeit wurde die fermentative Umwandlung von ^{14}C -Stearinsäure in Ölsäure in vitro bewiesen. Durch Isolierung aktiver Azelainsäure aus dem Oxydationsprodukt des Reaktionsgemisches ist die Umwandlung von Stearinsäure in Ölsäure gesichert.

Die von Le Breton beschriebene Methode einer Fermentanreicherung führt wohl zu Präparaten, die Methylenblau in Gegenwart von Stearin- und anderen höheren Fettsäuren sehr rasch entfärben. Eine Umwandlung von Stearinsäure in Ölsäure findet jedoch nicht statt. Es muss sich deshalb voraussichtlich um eine Anreicherung von anderen Dehydrogenasen handeln.

Die Umwandlung von Stearinsäure in Ölsäure gelang mit Lebergesamthomogenat. Wurde dieses Gesamthomogenat in Mitochondrien einerseits und Mikrosomen, Cytoplasma etc. andererseits fraktioniert, so enthielt die letztere Fraktion die Dehydrogenase für höhere Fettsäuren, während die Mitochondrien sie aller Wahrscheinlichkeit nach nicht enthalten.

Der Einbau von ^{14}C -Stearinsäure in die in den Fermentextrakten enthaltenen Lipide konnte gezeigt werden.

LITERATURVERZEICHNIS

1. R. Schoenheimer und D. Rittenberg, *J. biol. Chem.* 113, 505 (1936)
2. De Witt Stetten jr. und R. Schoenheimer, *J. biol. Chem.* 133, 329 (1940)
3. U. Gloor, Diss. phil.-naturw. Fakultät Basel 1953
4. K. Bernhard, M. Rothlin und H. Wagner, *Helv.* 41, 1155 (1958)
5. G. Quagliariello *Atti Acad. Lincei* 16, 387 (1932)
6. G. Quagliariello *Atti Acad. Lincei* 16, 552 (1932)
7. G. Quagliariello *Arch. Scienze Biol.* 27, 163 (1941)
8. Syunitiro Yosii *J. Biochemistry (Japan)* 26, 397 (1937)
9. K. Lang *Z. physiol. Chem.* 261, 241 (1939)
10. K. Lang und H. Mayer *Z. physiol. Chem.* 261, 249 (1939)
11. K. Lang und H. Mayer *Z. physiol. Chem.* 262, 120 (1939/40)
12. K. Lang und F. Adickes *Z. physiol. Chem.* 262, 123 (1939/40)
13. H. D. Cremer, *Z. physiol. Chem.* 263, 240 (1940)
14. H. Glaser, *Z. physiol. Chem.* 266, 123 (1940)
15. E. Annau, *Enzymologie* 9, 150 (1940)
16. E. Annau, A. Eperjessy und O. Felszeghy, *Z. physiol. Chem.* 277, 58 (1942)
17. E. Annau, A. Eperjessy und Z.-L. Zanthurczky, *Z. physiol. Chem.* 279, 66 (1943)
18. F. P. Mazza und L. Marfori *Arch. Science Biol.* 27, 142 (1941)
19. F. P. Mazza *Ergebnisse der Enzymforschung IX*, 207 (1943)
20. B. Shapiro und E. Wertheimer *Biochem. J.* 37, 102 (1943)
21. J. Champougny und E. Le Breton *Compt. rend. soc. biol.* 139, 919 (1945)
22. J. Champougny und E. Le Breton *Compt. rend. soc. biol.* 141, 43 (1947)
23. J. Champougny und E. Le Breton *Compt. rend. soc. biol.* 141, 45 (1947)
24. J. Champougny und E. Le Breton *Compt. rend. soc. biol.* 141, 450 (1947)
25. J. Clément-Champougny und E. Le Breton, *Compt. rend. soc. biol.* 141, 729 (1947)
26. J. Clément-Champougny und E. Le Breton, *Arch. Sci. Physiol.* 2, 243 (1948)
27. A. Jacob und M. Pascaud, *Compt. rend. soc. biol.* 143, 1476 (1949)
28. A. Jacob *Compt. rend. soc. biol.* 147, 1044 (1953)
29. A. Jacob und E. Le Breton *Congr. intern. biochim., Résumés communs*, 2e Congr. Paris 1952, 159.
30. A. Jacob *Compt. rend.* 237, 101 (1953)
31. A. Jacob *Compt. rend.* 242, 2180 (1956)
32. K. Burton *Nature* 161, 606 (1948)
33. P. Fantl und G. J. Lincoln *Australian J. of exp. Biol.* 27, 403 (1949)
34. Tatsu Koyanagi und Harunobu Noro, *J. Agr. chem. soc. Japan* 28, 825 (1954)
35. Tatsu Koyanagi und Harunobu Noro, *J. Agr. chem. soc. Japan* 28, 894 (1954)
36. W. Franke, G. Taschen und H. Frehse *Z. physiol. Chem.* 303, 58 (1956)
37. T. Thunberg, *Skand. Arch. Phys.* 35, 163
38. V. R. Potter und C. A. Elvehjem, *J. biol. Chem.* 114, 495 (1936)
39. C. L. Reimer und W. Will, *Ber. deutsch. chem. Ges.* 19, 3321 (1886)
40. D. Swern und J. T. Scanlan *Biochem. Prep.* 3, 118 (1953)
41. G. S. Myers, *J. Amer. chem. Soc.* 73, 2100 (1951)
42. H. P. Kaufmann und O. Schmidt, *Fette und Seifen* 47, 294 (1940)
43. G. H. Hogeboom, W. C. Schneider und G. E. Pallade, *J. biol. Chem.* 172, 619 (1948)
44. C. F. H. Allen und C. V. Wilson, *Org. Synth.* 26, 52 (1946)
45. M. Calvin, *Isotopic Carbon*, John Wiley & Sons, New York-London 1949
46. E. von Rudloff, *J. Am. Oil chem. Soc.* 33, 126 (1956)
47. H. Wagner, L. Abisch und K. Bernhard *Helv.* 38, 1536 (1955)
48. F. A. Isherwood und C. S. Hanes, *Biochem. J.* 55, 824 (1953)
49. K. Felix, M. Decker und L. Roha, *Z. physiol. Chem.* 294, 79 (1953)

CURRICULUM VITAE

Am 2. Februar 1926 wurde ich, John von Bülow-Köster, von Basel, in Reichenberg (Böhmen), damals und heute Tschechoslowakei, als Sohn des Roland Köster und seiner Ehefrau Theodora, geb. von Liebieg, geboren. Unmittelbar nach dem Ableben meines Vaters kam ich im Januar 1936 nach „Summer Fields“, St. Leonards-on-Sea, Sussex (England) in die Schule, bis zum Ausbruch des Krieges. Anschließend besuchte ich das S.L.E.H. Schloss Glarisegg bei Steckborn (Thurgau) bis zur bestandenen Maturitätsprüfung im Herbst 1944. Im Jahre 1947 wurde ich von meinem Onkel und meiner Tante, Dankward-Christian von Bülow und Helene von Bülow, geb. von Liebieg, von und in Novazzano (Ticino) adoptiert.

Im Wintersemester 1946/47 begann ich mein Chemiestudium an der Universität Basel und wählte in der Folge Mineralogie, Physikalische Chemie und Geologie als Nebenfächer. Bei folgenden Dozenten habe ich Vorlesungen und Praktika besucht: K. Bernhard, H. Dahn, H. Erlenmeyer, C. Grob, P. Huber, H. Kuhn, W. Kuhn, E. Miescher, H. Mohler, T. Reichstein, M. Reinhard, H. Reinhardt, E. Schlittler, A. Speiser, Ch. Tamm, L. Vonderschmitt und R. Wizinger.

Im Wintersemester 1953/54 kam ich an das Physiologisch-chemische Institut der Universität, wo in der Folge die vorliegende Dissertation unter Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Bernhard und der Assistenz von Herrn Dr. H. Wagner entstand. Seit September 1958 bin ich als Assistent an diesem Institut tätig.

